

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERECTORÍA DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENEMES (mIC) FRENTE A LA TÉCNICA DE PCR PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS (BGN) Y BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES (BGNNF) DEL LCRSP, 2015- JUNIO 2017.

TESIS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA

ELABORADO POR
JACKELINE MORÁN PIMENTEL

ASESOR: DR. CARLOS BRANDARIS

PANAMÁ

2018

DEDICATORIA

A Luca's, mi hijo, la razón de mi vida y la única persona que me motiva día a día a mejorar. Te amo mi niño.

AGRADECIMIENTOS

A la Red Nacional de Vigilancia en Microbiología Clínica por los aislamientos enviados y al Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública del ICGES por el apoyo brindado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	13
FUNDAMENTO TEÓRICO	18
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	40
DISEÑO DEL ESTUDIO	41
ASPECTOS METODOLÓGICOS	42
ASPECTOS ÉTICOS	46
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructuras químicas de antibióticos carbapenémicos.	27
Fig. 2. Esquema de la PCR punto final.	38
Fig. 3. Esquema del Método de Inactivación de Carbapenems.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	43
Tabla 2. Programa de amplificación.	43
Tabla 3. Resultado de la prueba de evaluación diagnóstica (Método de inactivación de Carbapenems) frente a la prueba de oro (PCR punto final) en Bacilos gram negativos.	47
Tabla 4. Tabla de contingencia del Método de Inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN).	48
Tabla 5. Validez de la prueba diagnóstica: Determinación de la Sensibilidad y especificidad del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN).	48
Tabla 6. Seguridad de la prueba diagnóstica: Determinación del valor predictivo positivo y negativo del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN).	48
Tabla 7. Determinación del nivel de concordancia (Índice Kappa) del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN) con respecto a la prueba de oro.	49
Tabla 8. Resultado de la prueba de evaluación diagnóstica (Método de inactivación de Carbapenems) frente a la prueba de oro (PCR punto final) en Bacilos gram negativos no fermentadores.	50
Tabla 9. Tabla de contingencia del Método de Inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos no fermentadores (BGNNF).	51

Tabla 10. Validez de la prueba diagnóstica: Determinación de la Sensibilidad y especificidad del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos no fermentadores (BGNNF).	51
Tabla 11. Seguridad de la prueba diagnóstica: Determinación del valor predictivo positivo y negativo del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF).	52
Tabla 12. Determinación del nivel de concordancia (Índice Kappa) del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos no fermentadores (BGNNF) con respecto a la prueba de oro.	52

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- 1.1. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- 1.2. mIC: Método de inactivación de carbapenems.
- 1.3. CIM: concentración inhibitoria mínima.
- 1.4. BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.
- 1.5. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- 1.6. BGN: Bacilo gram negativos.
- 1.7. BGNNF: Bacilo gram negativos no fermentadores.
- 1.8. KPC: Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasas.
- 1.9. MBL: Metalobetalactamasas.
- 1.10. NDM: Metalobetalactamasa New Delhi.
- 1.11. Oxa: oxacilinasas.
- 1.12. ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- 1.13. Tm: Temperatura de melting.
- 1.14. ICGES: Instituto Conmemorativa Gorgas de Estudios de la Salud.

DEFINICIONES

- 1.15. Resistencia antimicrobiana: es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible.
- 1.16. Carbapenemasa: enzimas que actúan sobre los antibióticos betalactámicos subclase carbapenems.
- 1.17. AmpC plasmídica: Las β -lactamasas AmpC pueden hidrolizar penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactams, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos.
- 1.18. Antimicrobiano: se refiere a un conjunto de compuestos que tienen la capacidad de inhibir o eliminar la proliferación de bacterias.
- 1.19. Impermeabilidad: mecanismo de resistencia de membrana en donde hay cambios en el diámetro y/o número de porinas que pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria.
- 1.20. Porinas: son proteínas de la membrana externa en las bacterias Gram-negativas, que funcionan como canales de transporte de diferentes moléculas hidrofílicas, con grados de selectividad y complejidad.
- 1.21. Bombas de Eflujo: mecanismo de resistencia de membrana en donde se transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones y sin acción antimicrobiana.
- 1.22. Tasa de Mortalidad: indican el número de defunciones por lugar, intervalo de tiempo y causa.

RESUMEN

La detección de Bacilos gram negativos (BGN) y bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) productores de carbapenemasas es un reto para los laboratorios de microbiología clínica. En Panamá, la sospecha de la presencia de estas enzimas es a través de los equipos automatizados Vitek 2C en donde los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) para el antibiótico Imipenem es de ≥ 1 ug/mL y de Meropenem ≥ 2 ug/mL; sin embargo existen otros mecanismos de resistencias como las cefalosporinasas tipo AmpC, que pueden causar alteraciones en los valores del CIM de los antibióticos carbapenémicos; de igual manera estas bacterias pueden presentar mecanismos de membrana como lo son impermeabilidad o pérdidas de porinas y bombas de eflujo; todo esto conlleva a un reporte incorrecto por los laboratorios de microbiología o un tratamiento inapropiado al paciente.

Ese estudio permite sospechar de mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos en bacilos gram negativos, utilizando insumos y reactivo de uso rutinario en los laboratorios de microbiología.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos hace unos años era un evento poco común, especialmente en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, en los últimos años han aumentado los reportes de cepas resistentes a carbapenems. Por otro lado, la resistencia a carbapenems es más frecuente en bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) como la *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter spp.*

Las investigaciones han demostrado que para adquirir resistencia a los carbapenems se requiere de la combinación de varios mecanismos de resistencia. La combinación más importante reportada hasta el momento ha sido la producción de una β -lactamasa (AmpC y carbapenemasas) junto a la disminución de la permeabilidad de la membrana externa por la pérdida de porinas.

La emergencia de resistencia no solo limita el uso de terapias efectivas, sino que también favorece el crecimiento y diseminación de patógenos resistentes, derivados de la presión selectiva que ejercen antimicrobianos empíricos inapropiados que eliminan las poblaciones susceptibles.

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos requiere laboratorios de microbiología que puedan identificar con exactitud los microorganismos resistentes. La detección de mecanismos de resistencia en bacilos gram negativos y bacilos gram negativos no fermentadores tiene una gran repercusión clínica y epidemiológica. Existen muchos métodos fenotípicos para la detección de mecanismos de resistencia a los carbapenems, sin embargo, se requiere insumos pocos disponibles para los laboratorios y algunos pueden tener un costo elevado como las técnicas moleculares. La detección

en pacientes de BGN Y BGNNF productores de carbapenemasas de manera oportuna, permitirá implementar precauciones de contacto y facilitará un abordaje terapéutico apropiado. Este estudio propone evaluar el método de inactivación de carbapenems (mIC) frente al “gold Estándar” la prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de manera que permita ofrecer una opción costo efectiva para el abordaje inicial ante estas enzimas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo).

Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

Están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad.

La emergencia de resistencia a los antibióticos no solo limita el uso de terapias efectivas, sino que también favorece el crecimiento y diseminación de patógenos resistentes, derivados de la presión selectiva que ejercen antimicrobianos empíricos inapropiados que eliminan las poblaciones susceptibles.

La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* (una bacteria intestinal común que puede causar infecciones potencialmente mortales) al tratamiento utilizado como último recurso (los antibióticos carbapenémicos) se ha propagado a todas las regiones del mundo. *K. pneumoniae* es una importante causa de infecciones nosocomiales, como la neumonía, la sepsis o las infecciones de los recién nacidos y los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. Debido a la resistencia, en algunos países los antibióticos carbapenémicos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*.

Actualmente, los métodos para vigilar la resistencia microbiana pueden clasificarse en tres tipos: in vivo, in vitro y moleculares. El grado en que se usa cada uno de estos métodos depende del agente patógeno o enfermedad de que se trate y de las instalaciones disponibles. Los métodos in vitro son los preferidos para la vigilancia de la resistencia de la gran mayoría de las bacterias patógenas, incluso la de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, no hay un método estandarizado internacional único. Hay técnicas modernas que han facilitado el desarrollo y la aplicación de métodos moleculares para determinar la presencia de genes que codifican resistencia específica en los microorganismos que podrían constituir la base de sistemas para vigilar la resistencia a los antimicrobianos. Los métodos moleculares, sin embargo, utilizan tecnologías complejas, la cual no se dispone en muchos laboratorios de microbiología.

Por lo tanto, se hace indispensable la disponibilidad de una prueba sensible, específica, comparable con las técnicas moleculares en los laboratorios para la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos (BGN) y bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF).

¿Cuál es la exactitud o validez diagnóstica de métodos fenotípicos (Método de inactivación de carbapenems mIC) con respecto a pruebas moleculares (PCR)?

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Cuando las bacterias se vuelven resistentes a los medicamentos, se reducen las opciones para tratar las enfermedades que provocan. Esa resistencia a los medicamentos antimicrobianos ocurre en todas partes del mundo y afecta a una amplia selección de microorganismos, con una creciente prevalencia que amenaza la salud humana y animal. Las consecuencias directas de una infección por microorganismos resistentes pueden ser graves, ejemplo, enfermedades más largas, mayor mortalidad, estancias prolongadas en el hospital, pérdida de protección en el caso de los pacientes que se someten a operaciones y otros procedimientos médicos, e incremento de los costos. La resistencia a los antimicrobianos afecta a todos los ámbitos de la salud, implica a muchos sectores y tiene efectos en el conjunto de la sociedad.

La resistencia a los antimicrobianos erosiona la economía mundial con pérdidas económicas debidas a la menor productividad a causa de la enfermedad (de los seres humanos y también de los animales) y al incremento de los costos de tratamiento. Para combatirla se requieren inversiones a largo plazo, por ejemplo, apoyo financiero y técnico a los países en desarrollo, en el desarrollo de nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones, y en el fortalecimiento de los sistemas de salud para utilizar los agentes antimicrobianos, y acceder a ellos, de forma más adecuada.

La resistencia a los antimicrobianos puede afectar a todos los pacientes y sus familias. Algunas de las enfermedades infantiles más comunes en los países en desarrollo paludismo, neumonía, otras infecciones respiratorias y disentería ya no se curan con muchos de los antibióticos o medicamentos más antiguos. En países de ingresos bajos,

es crucial contar con antibióticos eficaces y accesibles para salvar las vidas de niños con esas enfermedades, y otras afecciones como las bacteriemias.

Los primeros datos publicados por la Organización Mundial de la Salud sobre la vigilancia de la resistencia a los antibióticos indican que los niveles de resistencia a algunas infecciones bacterianas graves son elevados tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos.

El nuevo Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la Organización, denominado GLASS por sus siglas en inglés, ha revelado la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas.

Las bacterias resistentes más frecuentes eran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella* spp.

En los pacientes en los que se sospechó una infección sanguínea se observó una amplia variación entre países en la proporción de los que presentaban resistencias bacterianas al menos a uno de los antibióticos más utilizados, desde un 0% hasta un 82%. La resistencia a la penicilina, el fármaco utilizado durante décadas en todo el mundo para tratar la neumonía, osciló entre un 0% y un 51% en los países estudiados. Además, entre un 8% y un 65% de las muestras de *E. coli*, una bacteria que causa infecciones de las vías urinarias, presentaba resistencia al ciprofloxacino, un antibiótico utilizado habitualmente para tratar estas infecciones.

El Dr. Marc Sprenger, director de la secretaría para la resistencia a los antimicrobianos de la OMS, señala que «el informe confirma la grave situación que representa la resistencia a los antibióticos en todo el mundo».

En España, se han llevado a cabo 2 estudios multicéntricos en los años 2000 y 2010. En el año 2010, el 94% de los aislados eran multirresistentes y el 86% presentaron resistencia extrema, resultando preocupante que el 2% de los aislados eran ya pan-resistentes (no se identificó ninguno en 2000). La resistencia a carbapenémicos ha aumentado significativamente entre 2000 y 2010, habiéndose observado también incrementos en las tasas de resistencia a ceftazidima, piperacilina y colistina. Todo ello supone una seria limitación en las opciones terapéuticas frente a agentes no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. (7)

Antes del año 2010 en Panamá la resistencia a las carbapenems era poco conocida, aún más en BGN y BGNNF; los principales mecanismos detectados eran las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) e impermeabilidad.

Durante el año 2010 en Panamá se registraron muertes por infecciones intrahospitalarias dando paso a uno de los eventos de salud pública más importantes del país la carbapenemasa de *K. pneumoniae* (KPC) se trataba de una enzima plasmídica epidémica asociada a un aumento importante en las tasas de mortalidad y morbilidad en los lugares donde ocurría, con un importante potencial de diseminación. (2).

Existen otras carbapenemasas presentes BGNNF como las Metalobetalactamasas (MBL) comunes en *Pseudomonas aeruginosa* y las oxacilinasas carbapenemasas (OXA) presentes en el complejo *Acinetobacter baumannii* cuyo diagnóstico por parte del laboratorio clínico se hace difícil ya que los equipos automatizados no las diferencian; además se evidencia que los valores de los CIM (concentración inhibitoria mínima) son elevados en casi todas las familias de antibióticos, en particular los β -lactámicos.

Las técnicas moleculares son consideradas los métodos de referencia para confirmar la presencia de los genes de carbapenemasas, estas técnicas no suelen estar disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos, por lo que es importante implementar una metodología fácil, de bajo costo, confiable y accesible, que permita un diagnóstico lo bastante rápido al mismo nivel que las pruebas moleculares.

El concepto de “diagnóstico molecular” es un término amplio que incluye técnicas de extracción, amplificación, cuantificación e hibridación de material genético (DNA o RNA). En la actualidad, cerca del 50-60% del diagnóstico molecular se ha enfocado principalmente en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, siendo las encefalitis y meningitis las que abarcan un gran porcentaje de las pruebas disponibles, dado que el diagnóstico molecular es mucho más sensible que la detección por métodos microbiológicos clásicos.

Los altos valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares las han transformado en el gold standard para el diagnóstico de patologías infecciosas (Espy MJ, 2006). La eficiencia de las técnicas moleculares radica en sus altos porcentajes de sensibilidad (70-99%) y especificidad (86-100%), con un tiempo de detección de 1 a 4 h, en promedio (Tsongalis GJ, 2006). (8)

Este trabajo pretende evaluar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de inactivación de carbapenemasas mIC frente a la prueba de referencia PCR en aislamientos clínicos de BGN y BGNNF teniendo en cuenta las nuevas recomendaciones de la M100 S27 de la CLSI y del artículo publicado por Kim et. Al. La detección de los mecanismos de resistencia en los microorganismos gram negativos tiene una gran repercusión clínica y epidemiológica, existiendo aún hoy en día una cierta

discusión sobre cuál es la mejor técnica fenotípica para este fin, así como si se deben o no interpretar los resultados in vitro de sensibilidad.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Bacilos gram negativos (BGN)

Las infecciones por especies de BGN como la *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, y *Serratia spp*, a menudo son intrahospitalarias, y se producen principalmente en pacientes con alteraciones de las defensas orgánicas. Por lo general, géneros como *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, y *Serratia spp* causan infecciones variadas, entre ellas, bacteriemias, infecciones de las heridas quirúrgicas, infecciones de los catéteres vasculares e infecciones respiratorias o urinarias que se manifiestan en forma de neumonía, cistitis o pielonefritis, y que pueden progresar a abscesos pulmonares, empiema, bacteriemia y sepsis. Ejemplo, la neumonía por *Klebsiella spp*, se manifiesta por formación de abscesos pulmonares y empiema. Los grupos de *Serratia*, en especial la *S. marcescens*, tiene una mayor afinidad por el tracto urinario. Los *Enterobacter* causan más a menudo infecciones intrahospitalarias, pero pueden causar otitis media, celulitis y sepsis neonatal.

El tratamiento se lleva a cabo con cefalosporinas de tercera generación, cefepima, carbapémicos, fluoroquinolonas, piperacilina/tazobactam o aminoglucósidos. Sin embargo, dado que algunos aislamientos son resistentes a múltiples antibióticos, son esenciales las pruebas de susceptibilidad.

Las cepas de *Klebsiella spp* que producen β -lactamasas de espectro extendido pueden desarrollar resistencia a las cefalosporinas durante el tratamiento, especialmente a ceftazidima. Estas cepas son inhibidas en grado variable por los inhibidores de las β -lactamasas (p. ej., sulbactam, tazobactam, ácido clavulánico). Se han aislado especies

de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas (KPC) en los Estados Unidos y en otros países, lo que hace muy problemático al tratamiento de algunas infecciones.

Las cepas de *Enterobacter* spp. pueden volverse resistentes a la mayoría de los β -lactámicos, incluso las cefalosporinas de tercera generación; la enzima β -lactamasa que producen no es inhibida por los inhibidores de β -lactamasas comunes (clavulanato, tazobactam, sulbactam). Sin embargo, estas cepas de *Enterobacter* spp. pueden ser sensibles a los carbapémicos (Imipenem, meropenem, ertapenem). Se han detectado también Enterobacterias resistentes a carbapenemasas. En ciertos casos, la tigeciclina y quizás la colistina pueden ser los únicos antibióticos activos disponibles.

(10)

Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF)

Los Bacilos gram negativos no fermentadores como la *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos oportunistas que con frecuencia causan infecciones intrahospitalarias, especialmente en pacientes con asistencia respiratoria mecánica, pacientes quemados y aquellos con debilidades crónicas. Pueden infectar muchos sitios, y los cuadros suelen ser graves. El diagnóstico se establece con el cultivo. La elección de antibióticos depende del patógeno y debe estar guiada por el antibiograma, porque es común la resistencia.

Las *Pseudomonas* spp. son ubicuas y prefieren los ambientes húmedos. En los seres humanos, el patógeno más común de este grupo es la *P. aeruginosa*, pero también pueden producirse infecciones por *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* o *P. acidovorans*.

La mayoría de las infecciones por *P. aeruginosa* se producen en pacientes internados, en especial los debilitados o inmunocomprometidos. La *P. aeruginosa* es una causa frecuente de infecciones en las unidades de cuidados intensivos. Los pacientes infectados por HIV, especialmente los que están en etapas avanzadas, tienen riesgo de adquirir infecciones por *P. aeruginosa* extrahospitalaria.

Las infecciones por *Pseudomonas* spp, pueden aparecer en muchos sitios anatómicos, entre ellos, la piel, los tejidos subcutáneos, el hueso, los oídos, los ojos, el tracto urinario y las válvulas cardíacas. El sitio afectado varía según la puerta de entrada y la susceptibilidad del paciente. En pacientes internados en el hospital, el primer signo puede ser una septicemia por bacilos gramnegativos.

En los pacientes quemados, la región por debajo de la escara puede infiltrarse con abundantes microorganismos y actuar como foco para una bacteriemia posterior, que suele ser una complicación mortal.

Las heridas punzantes profundas de los pies a menudo se infectan con *P. aeruginosa*. Esto puede dar origen a fístulas, celulitis y osteomielitis.

Muchas infecciones por *Pseudomonas* spp. pueden producir bacteriemia. En pacientes no intubados sin un foco urinario detectable, y en especial si la infección se debe a otras especies y no a la *P. aeruginosa*, la bacteriemia indica que se administraron líquidos intravenosos o medicamentos contaminados, o que estaban contaminados los antisépticos utilizados al colocar la vía venosa. (11).

Resistencia a los antibióticos Betalactámicos

El primer antibiótico de esta clase la penicilina fue descubierto por Alexander Fleming en 1928, cuando estudiaba los cultivos de *Staphylococcus* spp, y era producida por una especie no caracterizada hasta el momento de *Penicilium* spp.

Estructura química

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades. Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas.

La estructura básica de las carbapenemas consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condiciona la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los betalactámicos de más

amplio espectro y actividad. Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario.

Los betalactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente causal. La actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica se relacionan mejor con el tiempo durante el cual dicha concentración excede la CIM ($T > CIM$). Para la mayoría de infecciones se considera adecuado que el tiempo que supera la CIM sea como mínimo del 40% del intervalo entre dosis; pero en pacientes neutropénicos o con meningitis es probable que sea mejor estar todo el tiempo por encima de la CIM. El efecto postantibiótico (EPA) consiste en la acción residual del antibiótico sobre la bacteria después de descender las concentraciones terapéuticas en la sangre y los tejidos por debajo de la CIM. En el caso de los antibióticos betalactámicos, el EPA es de corta duración, con la excepción de los carbapenémicos, que presentan un EPA apreciable tanto sobre grampositivos como sobre gramnegativos. Estos parámetros indican que alargar los intervalos entre dosis puede llevar a fracasos terapéuticos. Obviamente estas consideraciones no son válidas en el caso de betalactámicos con semivida muy prolongada, que se administran cada 24 h, como la ceftriaxona (parenteral) o la cefixima (oral). La actividad bactericida de los betalactámicos disminuye cuanto mayor es el tamaño del inóculo bacteriano; este hecho es especialmente relevante en el tratamiento de los abscesos, donde además las poblaciones bacterianas pueden hallarse en fase estacionaria. En infecciones con un gran

inóculo, como la neumonía nosocomial causada por bacilos gramnegativos (BGN) es también más fácil seleccionar mutantes resistentes, por lo que puede no ser adecuado el empleo de los betalactámicos en monoterapia. La combinación de penicilinas y aminoglucósidos es sinérgica frente a estreptococos y enterococos y la de penicilinas y cefalosporinas lo es también frente a ciertos BGN, sobre todo *Pseudomonas aeruginosa*. Este hecho tiene especial relevancia en el tratamiento de la endocarditis bacteriana, de las infecciones por *Pseudomonas* y de las infecciones en pacientes neutropénicos.

Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano. En las bacterias grampositivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína. Las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano.

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (gramnegativos) o mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos). Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que

es cuando se sintetiza la pared celular. Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros betalactámicos, por lo que se llaman PBP. La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de los betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas. Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la CIM de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas, pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes. Se define el fenómeno de tolerancia como la necesidad de una concentración al menos 32 veces mayor a la CIM para que un antimicrobiano destruya una cepa bacteriana.

Espectro de acción

Las carbapenémicos son los betalactámicos de más amplio espectro. Sólo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y son poco activos frente a *Clostridium difficile*. Ertapenem es poco activo frente a *P. aeruginosa*. Aztreonam, el único monobactámico disponible para uso clínico, posee una

excelente actividad sobre bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias.

Carbapenems

La obtención de la tienamicina (*Streptomyces cattleya*) es el momento clave en el desarrollo de los carbapenems. Sus propiedades antibacterianas la convertían en un antibiótico ideal, pero era químicamente inestable, por lo que se desarrolló un derivado estable que conservaba las buenas características antibacterianas, la N-formimidoil tienamicina o imipenem. Presentaba el inconveniente de ser inactivado por la dehidropeptidasa I renal (DHP-I), por lo que se asoció (1:1) a un inhibidor de esta enzima, la cilastatina. La asociación imipenem/cilastatina fue el primer carbapenem autorizado en terapéutica humana (EMEA, European Medicines Agency [Agencia Europea del Medicamento] 1985, España 1987). Posteriormente, se introdujeron el meropenem (EMEA 1994, España 1995), el ertapenem (EMEA 2001, España 2002) y en julio de 2008 la EMEA aprobó el doripenem que se ha introducido en España en mayo de 2009.

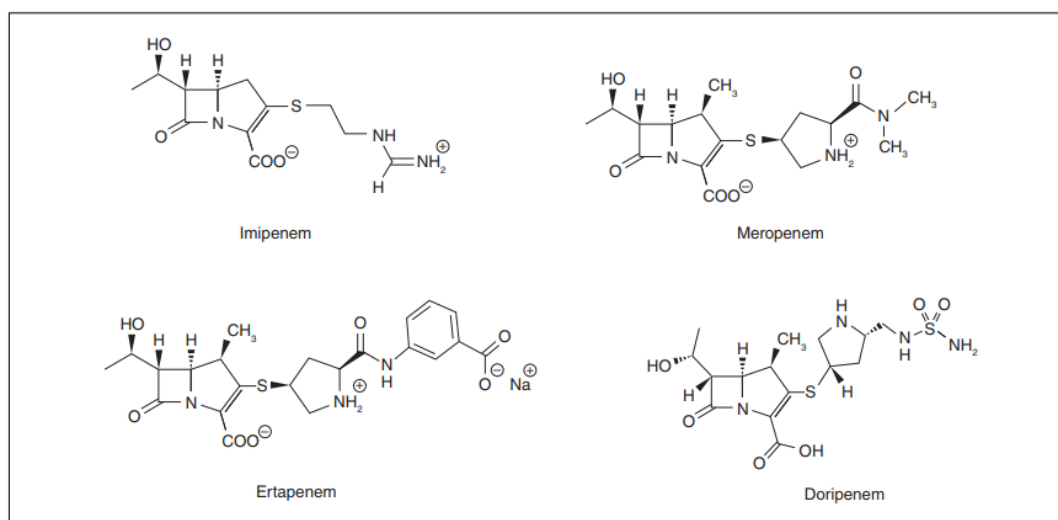
Estructura química y relación estructura/función

El anillo carbapenem es un azobiciclo formado por la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Posee en posición 1 un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo β -lactámico de muchas serino- β -lactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al β -lactámico. Los distintos carbapenems son fruto de sustituciones en 1 y 2. En imipenem los hidrógenos del C1 no están sustituidos, por lo

que es sensible a la DHP-I renal y potencialmente nefrotóxico. En meropenem, ertapenem y doripenem el H en posición β está sustituido por un metilo que le confiere estabilidad frente a esta enzima (1- β -metil-carbapenems). En 2, hay una cadena lateral tioacídica de carácter básico que diferencia a los distintos carbapenems determinando actividad antimicrobiana, potencial neurotóxico, atrapamiento por algunas bombas de expulsión, farmacocinética, etc. y colabora en la estabilidad frente a la DHP-I. En imipenem esta cadena es un iminometil-amino-etil-tio. En meropenem está sustituida por un grupo hidrofóbico dimetil-carbomoil-pirrolidin-tio que incrementa la actividad frente a gramnegativos y es responsable de la ligera disminución de actividad frente a grampositivos, y puede, además, explicar la reducción del efecto proconvulsionante observado en imipenem/ cilastatina. En ertapenem es un grupo carboxifenil amino-carbomoilpirrolidin-tio, similar al de meropenem, al que se une un grupo benzoato (carboxifenil). Este último aumenta el peso molecular (497,50) y la lipofilia de la molécula. El radical carboxílico, ionizado a pH fisiológico, proporciona una carga negativa y determina una mayor fijación proteica que es responsable de un aumento de la semivida de eliminación y permite una sola administración diaria. Su falta de actividad efectiva sobre *Pseudomonas aeruginosa* puede deberse al carácter aniónico, la lipofilia y el elevado peso molecular que dificultarían su penetración a través de las porinas OprD no alcanzando unas concentraciones adecuadas en el espacio periplásmico. Además, el peso molecular facilitaría su eliminación por las bombas de eflujo. En doripenem es una cadena lateral sulfamoil-aminometil-pirrolidin-tio que lo dota de la buena actividad de meropenem frente a gramnegativos y de la de imipenem frente a grampositivos. Su menor alcalinidad, en comparación con otros carbapenems,

determina un aumento de la actividad de la molécula frente a *P. aeruginosa*. Imipenem, meropenem y doripenem tienen un menor peso molecular (317,26; 437,51 y 420,51 respectivamente), son hidrofílicos y de estructura compacta y zwitteriónica, lo que permite una penetración rápida a través de las porinas de los gramnegativos.

Fig. 1. Estructuras químicas de antibióticos carbapenémicos.



Mecanismos de acción

Inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación uniéndose a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas PBP (penicillin binding protein, proteínas que fijan penicilinas). La pared celular se debilita y la bacteria normalmente se lisa². Por ello, son habitualmente bactericidas. Imipenem es menos bactericida que meropenem o doripenem en *P. aeruginosa*. El poder bactericida es rápido y dependiente del tiempo. Frente a *Listeria monocytogenes* meropenem y ertapenem se comportan como bacteriostáticos, aunque la actividad intracelular de meropenem es bactericida a las 24 h.

Para ejercer su acción deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, lo que es fácil en grampositivos, pero más complicado en gramnegativos. Sus características estructurales les permiten acceder a las PBP de las bacterias gramnegativas a través de las porinas de la membrana externa. En *P. aeruginosa* imipenem emplea exclusivamente la vía de la OprD mientras que meropenem y doripenem emplean ésta y, además, otras porinas. La penetración de ertapenem en esta bacteria no se ha estudiado.

Farmacocinética-farmacodinamia

Los carbapenems, como el resto de los β -lactámicos, son antimicrobianos con actividad dependiente del tiempo. Por este motivo, un parámetro de valoración de eficacia clínica adecuado es el denominado “tiempo sobre la CMI” ($T > CMI$), es decir, el tiempo –en porcentaje– del intervalo de dosificación en el que la concentración de antimicrobiano supera a las CMI de las bacterias diana. Por su elevado poder bactericida, efecto postantibiótico y elevada afinidad por PBP esenciales los carbapenems requieren un $T > CMI$ menor que otros β -lactámicos. Se ha sugerido que $T > CMI$ del 20% (el 30% en penicilinas y el 40% en cefalosporinas) son suficientes para lograr un efecto bacteriostático y $T > CMI$ del 30-40% (el 50% en penicilinas y el 60- 70% en cefalosporinas) son adecuados para garantizar un efecto bactericida máximo.

Indicaciones clínicas

Por el amplio espectro de actividad y especiales características farmacocinéticas, imipenem y meropenem están indicados en el tratamiento de infecciones nosocomiales graves. Son los antimicrobianos de elección en el tratamiento empírico de infecciones en las que se sospecha la implicación de microorganismos productores de BLEE o de AmpC que desarrollan resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, y en

pacientes que han recibido previamente antimicrobianos de amplio espectro por la posibilidad de haber seleccionado cepas multirresistentes. También son de elección en infecciones de etiología polimicrobiana o mixta.

Numerosos estudios clínicos han avalado la efectividad de ambos, bien en monoterapia o asociados a otros antimicrobianos, en el tratamiento nosocomial de bacteriemias y sepsis, infecciones graves de piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, infecciones intraabdominales (no indicado en las de adquisición comunitaria), infecciones urinarias complicadas, infecciones ginecológicas complicadas, y en la neumonía nosocomial grave. La mayor actividad de meropenem frente a *Pseudomonas* spp. determina que sea el fármaco de elección en la fibrosis quística y en el paciente neutropénico febril. Está indicado en el tratamiento de meningitis en niños y adultos, en especial en meningitis nosocomiales producidas por *Pseudomonas* spp. y bacilos gramnegativos resistentes a otros antimicrobianos. Algunos trabajos han demostrado su eficacia en meningitis por *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y cefalosporinas de tercera generación. La alta incidencia de convulsiones asociadas a imipenem limita su uso en esta indicación. Para evitar el desarrollo de resistencias, no deben utilizarse en profilaxis quirúrgica al haber otras alternativas con menor espectro, igual eficacia y más económicas. Ertapenem presenta un espectro más reducido que no incluye patógenos nosocomiales relevantes como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., lo que relega su uso al tratamiento de infecciones leves o moderadas adquiridas en la comunidad que precisan ingreso hospitalario.

Efectos ecológicos

Los más importantes derivan del impacto sobre la flora normal favoreciendo la colonización/infección por bacterias patógenas y/o multirresistentes y la inducción de resistencias. El efecto de todos los carbapenems sobre la flora fecal no es muy marcado debido a la escasa eliminación en heces. Además, tras la interrupción del tratamiento la flora fecal se recupera en 1-2 semanas. Pueden ocasionar diarrea asociada a antimicrobianos, incluida colitis pseudomembranosa, en un porcentaje muy bajo de pacientes (doripenem < 1%). Ocasionalmente, se han descrito colonizaciones y sobreinfecciones por microorganismos resistentes, como enterococos, estafilococos coagulasa negativa, *Pseudomonas* spp., etc. En unidades de oncología y hematología, con amplio uso de carbapenems, se ha comunicado un mayor aislamiento de *S. malthophilia*. La candidiasis oral y vulvar es frecuente tras la administración de doripenem¹⁸. Imipenem es inductor de la producción de AmpC en *P. aeruginosa*, *E. cloacae* y *C. freundii*, aunque habitualmente no produce desrepresión. Meropenem y doripenem tienen menor poder de inducción. El riesgo de inducción de resistencias con ertapenem es bajo siempre que se utilice adecuadamente. Se ha comunicado la emergencia de resistencia durante el tratamiento con ertapenem en una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. La ausencia de actividad de ertapenem frente a *P. aeruginosa* y otros BGNNF reduce la presión selectiva frente a estas bacterias y, en consecuencia, disminuye la probabilidad de selección de resistencias a otros carbapenems. Imipenem en enterobacterias es inductor de la producción de carbapenemasas cromosómicas de la clase A²⁸ y en *P. aeruginosa* de mutaciones en *nfxC* (aproximadamente en el 15-25% de los pacientes tratados) que determinan la pérdida

de la proteína OprD y, en consecuencia, resistencia a imipenem. Doripenem es poco inductor de resistencias a carbapenems en *P. aeruginosa* (10^{-9} doripenem y meropenem, 10^{-7} imipenem) y menos si se asocia a un aminoglucósido.

Mecanismos de resistencia

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias. Los mecanismos implicados son los siguientes:

1. Alteraciones de la permeabilidad. La presencia de membrana externa en los bacilos gramnegativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como los betalactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin. La resistencia es secundaria a alteraciones en dichas porinas.

2. Modificación de las dianas. Los betalactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las PBP implican una pérdida de afinidad de los betalactámicos por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad. Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos grampositivos.

3. Producción de enzimas. Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos, sobre todo en las bacterias gramnegativas. Las betalactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones¹². Actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBP. El

grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas. La producción de betalactamasas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (sólo en presencia de un betalactámico). En este sentido no todos los betalactámicos tienen el mismo poder de inducción, pudiendo ser desde poco a altamente inductores. En los microorganismos gramnegativos, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que en los estafilococos suelen ser inducibles. Las betalactamasas cromosómicas, que son producidas fundamentalmente por bacterias gramnegativas, pueden ser constitutivas o inducibles.

4. Expresión de bombas de eliminación activa. Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. Este mecanismo se ha demostrado en ciertos bacilos gramnegativos, especialmente en *P. aeruginosa*.

Las infecciones respiratorias agudas, las enfermedades diarreicas, el sarampión, el sida, el paludismo y la tuberculosis causan más del 85% de la mortalidad por infecciones en el mundo. La resistencia de los agentes infecciosos respectivos a los medicamentos de primera línea va desde cero hasta casi 100% y, en algunos casos, la resistencia a los fármacos de segunda y tercera línea afecta significativamente el resultado del tratamiento. A esto se agrega la importante carga de enfermedad que representan en todo el mundo las infecciones nosocomiales resistentes; los nuevos problemas que plantea la resistencia a los fármacos antivirales, y los problemas crecientes de resistencia a los medicamentos entre las enfermedades parasitarias, como la tripanosomiasis africana y

la leishmaniasis. El aumento masivo del comercio y los movimientos humanos como consecuencia de la globalización han permitido que los agentes infecciosos, incluidos los farmacorresistentes, se propaguen rápidamente. Si bien en los países más ricos, en gran parte, todavía se puede confiar en la eficacia de los medicamentos antimicrobianos más nuevos para tratar las infecciones resistentes, en muchas otras partes del mundo el acceso a tales fármacos a menudo es limitado, cuando no se carece de ellos del todo.

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural. Cada vez que se ha puesto en uso un nuevo agente antimicrobiano en el ámbito clínico, el laboratorio ha detectado a continuación cepas de microorganismos resistentes al mismo, es decir, cepas que pueden reproducirse en presencia de concentraciones mayores del fármaco de las que se administra a las personas en dosis terapéuticas. Este tipo de resistencia puede resultar de una característica de toda la especie o presentarse entre cepas de especies que por lo general son sensibles, pero desarrollan resistencia por mutación o transferencia genética. Los genes resistentes codifican varios mecanismos por medio de los cuales los microorganismos pueden resistir los efectos inhibitorios de agentes antimicrobianos específicos. Tales mecanismos también generan resistencia a otros antimicrobianos de la misma clase y, a veces, a muchos compuestos de diferentes clases. (13).

La resistencia a antibióticos, sobre todo la resistencia combinada a múltiples familias, es una prioridad de primer orden para los enfermos, la comunidad, los profesionales de la salud y la salud pública. En los últimos años la resistencia a los antimicrobianos ha aumentado considerablemente hasta convertirse en una emergencia sanitaria según todas las agencias internacionales de salud. Las enterobacterias son una

de las familias bacterianas que presentan con mayor frecuencia resistencia a múltiples antibióticos. El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos en enterobacterias es el enzimático, debido a la producción de Betalactamasas. Las Betalactamasas que por su perfil hidrolítico y prevalencia han tenido una mayor relevancia clínica en la primera década del siglo XXI son las que generan resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, como las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y las Cefalosporinasas del tipo AmpC; en ambos casos los antibióticos carbapenémicos, como son el imipenem, el meropenem, el doripenem y el ertapenem, mantienen su actividad. Sin embargo, durante los últimos años se ha producido la aparición y dispersión de enterobacterias productoras de enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, incluyendo los antibióticos carbapenémicos, lo cual limita de manera importante el arsenal terapéutico frente a estas bacterias. Estas enzimas, denominadas genéricamente carbapenemasas, pertenecen en su mayoría a 3 clases diferentes, según la clasificación molecular de Ambler:

- Clase A, principalmente enzimas del tipo KPC.
- Clase B Metalobetalactamasas (MBL) dependientes de zinc, principalmente enzimas del tipo VIM, IMP, SPM y NDM.
- Clase D o serin-carbapenemasas (principalmente OXA-48). (4)

La aparición y propagación de bacilos gram-negativos productores de carbapenemasa es una amenaza emergente para la salud pública. En particular, en los hospitales y centros de salud, esto supone un mayor problema con los carbapenems ya que cada vez son más necesarios para tratar las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas que producen Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Para prevenir la propagación de los productores de carbapenemasas, la detección rápida de estas bacterias se ha convertido en imperativo; ya que la resistencia a carbapenems se evalúa en ensayos de susceptibilidad fenotípica en platos de agar o en sistemas automatizados de microbiología. Sin embargo, la concentración de inhibición mínima o (MIC) no necesariamente reflejan la producción de carbapenemasas, ya que otros mecanismos tales como pérdida de porinas o aumento de la actividad de la bomba de eflujo, debido a alteraciones cromosómicas en los genes, también puede causar resistencia.

Por lo tanto, la distinción entre la resistencia a carbapenems mediada por carbapenemasas y resistencia mediada por otros mecanismos es importante para el control de la infección. (3)

Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa) es una forma de clonación del ADN, puramente enzimática que se realiza totalmente in vitro. Representa uno de los avances más importantes y actuales de la historia de la biotecnología.

Hasta mediados de los años 80 la única estrategia posible para aislar un gen y disponer de grandes cantidades para su análisis era el clonado celular. En 1986, Kary B. Mullis descubrió la PCR, técnica que permite sintetizar grandes cantidades de ADN in vitro de una manera simple y elegante basándose en el procedimiento de replicación del ADN que la célula emplea in vivo. El descubrimiento le valió a Mullis el Premio Nobel en 1993.

La PCR es un método rápido de amplificación in vitro de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra. Habitualmente la reacción se diseña para permitir la amplificación selectiva de una o varias secuencias diana de ADN presente en una mezcla compleja de secuencias (por ejemplo, ADN genómico total). Para que la amplificación sea posible es absolutamente necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia a amplificar. Esta información permite la construcción de dos oligonucleótidos (oligos), habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, complementarios de los extremos 3' de la secuencia diana, que actuaran como cebadores (iniciadores, en inglés primers) en la reacción. Cuando se mezclan con ADN genómico desnaturalizado, los cebadores se unen específicamente a las secuencias complementarias de la región genómica que se quiere amplificar, quedando sus extremos 3' OH enfrentados. Los oligos están diseñados para que puedan iniciar la reacción de síntesis de ADN en presencia de un ADN polimerasa termoestable adecuada y de los precursores de ADN (los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Cada oligo servirá para iniciar la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una de las hebras del segmento de la diana, y las dos hebras de nueva síntesis serán complementarias entre sí.

La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, la PCR habrá generado aproximadamente un millón de copias de la secuencia diana específica. Una vez amplificado el ADN se dispone ya de cantidad suficiente como para que este pueda ser caracterizado. Como en otros sistemas, se puede utilizar el método de Southern, con digestión enzimática y análisis de los fragmentos por

electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio o gel red y detectarlos como bandas discretas de un tamaño específico; o bien, detectar directamente una cierta secuencia en el producto de amplificación si se cuenta con sondas adecuadas. Se utiliza un ADN polimerasa termoestable debido a que la reacción pasa por ciclos en los que se cambia la temperatura, de esta manera se evita añadir la enzima manualmente en cada ciclo. Cada uno de los ciclos consta de las tres etapas siguientes:

- Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra: típicamente calentando la muestra a 93-95o C, durante unos 30 segundos, se consigue la separación de la doble hélice en dos cadenas sencillas por rotura de los enlaces de hidrógeno y consiguiente desapareamiento de las bases complementarias.
- Unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases: a temperaturas que varían entre 50 y 70 o C, dependiendo de la Tm (temperatura de fusión) del duplex esperado y durante un tiempo aproximado de unos 20 segundos, cada uno de los primers se une a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar.
- Síntesis de ADN: típicamente a 70-75 o C, comienza a funcionar la replicación incorporando nucleótidos sobre los primers y haciendo una copia completa y exacta de la cadena molde. (5)

Principales ventajas de la reacción

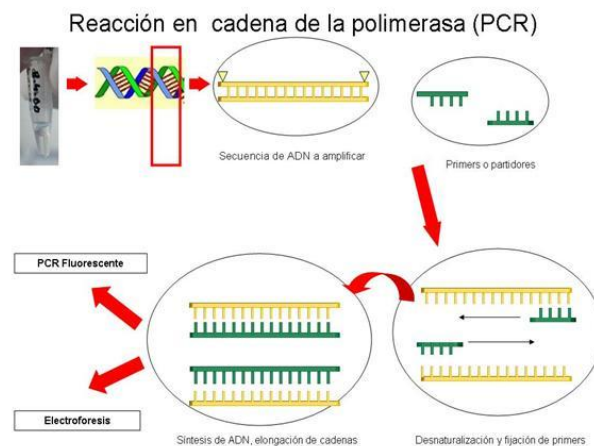
- Rapidez y sencillez de uso: La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura típicamente

de 3 a 5 minutos y se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado.

- **Sensibilidad:** La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana, incluso a partir de ADN contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, etc) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con ADN extraño.

- **Robustez:** La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología y paleontología molecular, por ejemplo, para el análisis de ADN recuperado de individuos momificados y para intentar identificar ADN de muestras fósiles que contienen poquísimas células de criaturas extintas hace ya mucho tiempo.

Fig.2. PCR punto final



Método de inactivación de carbapenems (mIC)

La diferenciación de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos mediados por carbapenemasas y la resistencia mediada por otros mecanismos es de vital importancia para el control de infecciones. En el año 2012 Patrice Nordmann , Laurent Poire desarrollaron un método rápido para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas llamado Carba NP; basado en la hidrólisis in vitro del antibiótico Imipenem.

Para realizar la CIM, se inicia con una suspensión en agua destilada del agente en estudio. Posteriormente, se sumerge un disco de 10 µg de meropenem; se incuba durante un mínimo de dos horas a 35°C. Después de la incubación, se retira el disco de la suspensión usando un asa de inoculación, y se coloca en una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con una cepa indicadora de E. coli susceptible (ATCC 29522) y posteriormente se incubó a 35°C. Si el aislamiento bacteriano produce carbapenemasa, el meropenem en el disco de susceptibilidad será inactivado permitiendo el crecimiento desinhibido de la cepa indicadora susceptible.

Según Kim Van Der Zwaluw, el método mIC en demuestra que es capaz de detectar la producción de carbapenemasa en Gram-negativos permitiendo distinguir entre la resistencia a carbapenems debido a la actividad beta-lactamasa y la permeabilidad reducida. Con una alta concordancia (100% para Enterobacteriaceae y 98,8% para no fermentadores) entre PCR que detectan los genes que codifican carbapenems y la actividad carbapenemasa detectada por mIC y que el valor predictivo positivo y negativo de 100% para Enterobacteriaceae en comparación con PCR. (3).

HIPOSTESIS

Ho: el método de inactivación de carbapenems (mIC) no es comparable frente a la técnica de PCR para la detección de carbapenemasas.

Ha: el método de inactivación de carbapenems (mIC) es comparable frente a la técnica de PCR para la detección de carbapenemasas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el método de inactivación de carbapenems (mIC) versus la prueba de referencia de genes de resistencia por PCR punto final en aislamientos clínicos de Bacilos gram negativos (BGN) y Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) para la detección de carbapenemasas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del Método Inactivación de Carbapenems (mIC).
- Evaluar el valor predictivo positivo y negativo del Método Inactivación de Carbapenems (mIC).
- Obtener el índice Kappa del mIC con respecto a la prueba de referencia.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Área de Estudio: Sección de Microbiología Clínica del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP). Resistencia a los antimicrobianos.

Tipo de Estudio: Estudio analítico de evaluación de pruebas diagnósticas.

Población: 160 aislamientos de BGN y BGNNF con y sin mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, recibidas en la sección de microbiología clínica del LCRSP.

Criterios de Inclusión y exclusión:

Inclusión: Todo aislamiento bacteriano identificado como bacilo gram negativo de la familia de las Enterobacteriaceae (género *Enterobacter spp*, *Morganella spp*, *Proteus spp*) y de No Fermentadores (género *Pseudomonas spp* y *Acinetobacter spp*) con mecanismo de resistencia a los antimicrobianos y con resultado de Conc. Inhibitoria Mínima (CIM) de Imipenem $\geq 2\mu\text{g/mL}$ y Meropenem $\geq 1\mu\text{g/mL}$

Exclusión: Todo aislamiento identificado como bacilo o cocos gram positivo.

Tamaño de la Muestra: 114 aislamientos de BGN y BGNNF con y sin mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. El valor se obtuvo de la siguiente manera:

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2 N}{e^2(N-1) + Z^2 \sigma^2}$$

Donde:

n = El tamaño de la muestra que queremos calcular

N = Tamaño del universo (160 aislamientos)

Z = Es el nivel de confianza deseado. (Nivel de confianza 95% / $Z=1,96$)

σ = desviación estándar (0.5)

e = error máximo (0.05%)

$$n = \frac{(1.96)^2(0.5)^2(160)}{(0.05)^2(160-1) + (1.96)^2(0.5)^2}$$

n = 114 aislamientos de BGN y BGNNF con o sin resistencia a los carbapenems.

ASPECTOS METODOLÓGICOS

Materiales y métodos

Se procesaron 114 aislamientos clínicos (cepas) del cepario del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud; las cuales procedían de diferentes hospitales de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Microbiología clínica de Panamá.

64 cepas pertenecientes al grupo de Bacilos gram negativos (BGN) del género: (*Enterobacter spp*, *Morganella spp*, *Proteus spp*) de las cuáles 48, cumplen los criterios de concentración inhibitoria mínima de (CIM) de Imipenem $\geq 2\mu\text{g}/\text{Ml}$, Meropenem $\geq 1\mu\text{g}/\text{mL}$ y positivas por lo genes (KPC-2, NDM-1, VIM, OXA 48), las otras 16 cepas presentaban una concentración inhibitoria mínima de (CIM) de Imipenem $< 2\mu\text{g}/\text{mL}$, Meropenem $< 1\mu\text{g}/\text{mL}$ y negativa para los genes (KPC-2, NDM-1, VIM, OXA 48).

El otro abordaje fue con 50 cepas del grupo de Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) del género: *Pseudomonas spp* y *Acinetobacter spp* de los cuáles 23 aislados tienen una concentración inhibitoria mínima de (CIM) de Imipenem $\geq 2\mu\text{g}/\text{mL}$, Meropenem $\geq 1\mu\text{g}/\text{mL}$ y positivas para los genes (VIM, IMP, SPM, KPC-2, OXA48, OXA23, OXA51) y las otras 27 cepas presentaban una concentración inhibitoria mínima de (CIM) de Imipenem $< 2\mu\text{g}/\text{mL}$, Meropenem $< 1\mu\text{g}/\text{mL}$ y negativa para los genes (VIM, IMP, SPM, KPC-2, OXA48, OXA23, OXA51).

Prueba de oro: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

El proceso de biología molecular inició con la extracción de ADN de los 114 aislamientos bacterianos por ebullición, donde se hizo una suspensión de 1uL de la bacteria en agua libre de nucleasas (100uL) se colocó el vial en el Thermomix a 100°C por 10 min; luego

se centrifugó a 14,000rpm por 5 min. Se transfirió 40uL del sobrenadante como ADN bacteriano a un tubo estéril y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento (15).

Para la determinación genotípica se utilizó el protocolo de amplificación estandarizado en el Servicio de Antimicrobianos, Instituto de Salud, “Dr. Carlos Malbrán”, Buenos Aires, Argentina (Servicio Antimicrobianos, 2008). Los primers utilizados fueron:

Tabla 1. Condiciones de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Gen	Secuencia 5´- 3´
KPC-2 forward	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG
KPC-2 reverse	AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA
NDM-1 forward	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC
NDM-1 reverse	GGC GTA GTG CTC AGT GTC
VIM forward	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G
VIM reverse	ATG AAA GTG CGT GGA GAC
IMP forward	GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA
IMP reverse	GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT
OXA 48 forward	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG
OXA 48 reverse	TGAGCACTTCTTTTGTGATG
SPM forward	CCTACAATCAACGGCGACC
SPM reverse	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC

Tabla 2. Programa de amplificación

Tamaño amplicón	Ciclado
VIM: 261pb IMP: 404 pb NDM: 512 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado= 30-35 ciclos: 94°C 30seg -- 50° 30seg -- 72°C 60seg; Extensión final = 72°C por 10min
Tamaño amplicón	Ciclado
KPC-2: 916pb OXA-48: 775pb SPM: 504pb	Desnaturalización inicial= 5 min. a95°C, 35 ciclos de 30 seg. A 95°C, 30 seg. a 52°C y 1 min. a72°C, Extensión final= 10 min. a72°C.

Corrida Electroforética

Preparación del gel de agarosa:

Para empezar se preparó el gel de agarosa al 2% con buffer TBE (Tris Boratos EDTA) el cual tiene el pH requerido y los iones necesarios para que fluya la corriente y pueda migrar el ADN. La agarosa se disolvió en el mismo buffer que se utiliza para la corrida se calentó hasta ebullición para disolver bien el polvo. La solución se agitó suavemente para evitar la formación de burbujas, y cuando se enfrió (aprox. 60°C) se le adicionó 2-3 gotas de gel red para teñir el ADN, este se vierte de una sola vez en el contenedor de geles al cual previamente se le colocó el peine para que se formen los pozos en donde se cargan las muestras.

Cargar las muestras:

En un parafilm colocamos 5uL del buffer de carga para cada muestra, luego adicionamos 1 uL del ADN amplificado y mezclamos suavemente con la micropipeta. La punta de la pipeta se mete un poco en el pozo y lentamente se vacía la pipeta para cargar el gel. Este mismo procedimiento se realiza con el control positivo y negativo del gen a testar. Se utilizó un marcador de peso molecular de Qiagen; se utilizó un voltaje de 100volts/ 1hora.

Para observar los fragmentos de ADN se utilizó un transiluminador de luz UV.

Prueba en Evaluación: Método de inactivación de carbapenems (mIC)

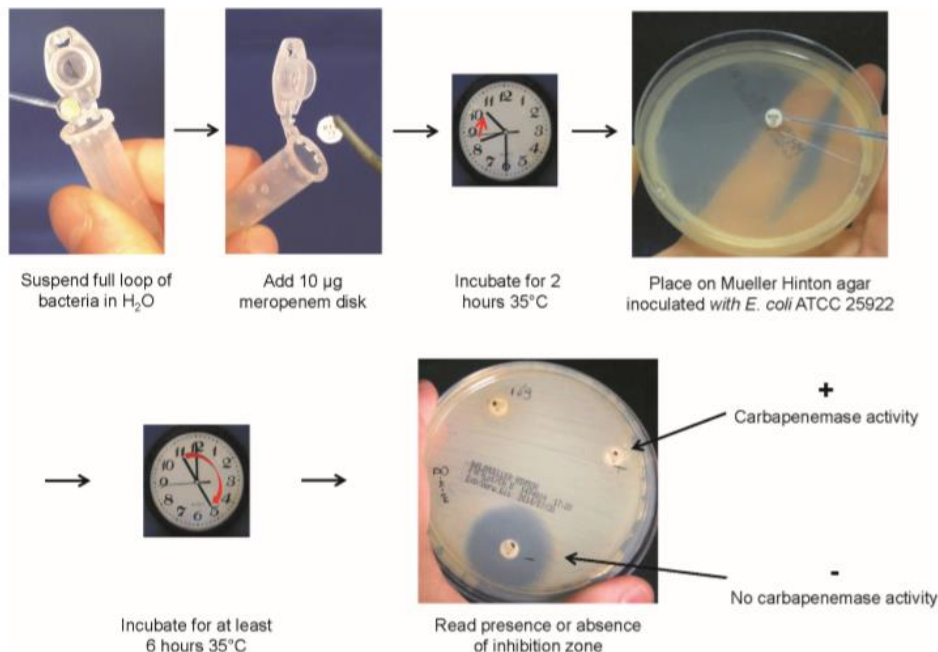
Se realizó una suspensión de cada uno de los aislamientos bacterianos con un asa de 10uL en 400uL de agua libre de nucleasas, seguidamente se les adicionó un disco que contiene 10ug de Meropenem (MastDisc) el mismo fue inmerso en la suspensión, para su posterior incubación de dos (2) horas a 35°C+/- 2°C.

Después de la incubación los discos fueron removidos de la suspensión con un asa y se colocaron (4 discos por plato) en un plato de agar Mueller Hinton, el cual previamente había sido inoculado con *Escherichia coli* ATCC 25922 al 0.5McF, la misma se estrió en el plato en tres direcciones cubriendo todo el agar utilizando un hisopo estéril y se incubó a 35°C+/- 2°C de 18 – 24 horas.

La lectura se basó en que si el aislamiento bacteriano produce carbapenemasa, la susceptibilidad del disco de Meropenem estará inactivada (sin halo de inhibición) no permitiendo el crecimiento de la cepa indicadora.

Si el aislamiento bacteriano no produce carbapenemasas, se observará una zona de inhibición clara.

Fig. 3. Esquema del Método de inactivación de carbapenems



ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se realizará con aislamientos clínicos procedentes de la colección de cepas de la sección de microbiología clínica del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública del ICGES; de acuerdo al procedimiento de conservación de cepas.

Las cepas serán identificadas con un número secuencial, agrupadas por el género bacteriano, de acuerdo a la base de datos que se registra en el sistema informático Whonet 5.6, como investigadora de este estudio no tendré ningún contacto con los pacientes o la institución que envía los aislamientos clínicos ya conservados en el LCRSP/ICGES; por lo tanto, no existe riesgos adicionales al paciente, ni beneficios directos a la institución que envía las cepas.

Estas cepas son alícuotas realizadas después que las mismas fueran procesadas como parte de la vigilancia en antimicrobianos que existe en el LCRP/ICGES. Los beneficios aportados a la comunidad se enmarcan principalmente a los laboratorios clínicos de microbiología clínica; ya que de obtenerse resultados satisfactorios de esta prueba en estudio se podrá implementar la búsqueda de BGN y BGNNF productores de carbapenemasas con insumos de muy bajo costo y con una prueba fácil de realizar e interpretar.

RESULTADOS

Tabla 3. Resultado de la prueba de evaluación diagnóstica (Método de inactivación de Carbapenems) frente a la prueba de oro (PCR punto final) en Bacilos gram negativos

Especies de Bacilos gram negativos	PCR	N°	mIC+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (38)	KPC-2	20	20
	NDM-1	7	7
	OXA-48	1	0
	Positivos	28	27
	Negativos	10	10
<i>Enterobacter cloacae complex</i> (13)	NDM-1	6	6
	KPC-2	3	3
	VIM	2	2
	Positivos	11	11
	Negativos	2	2
<i>Proteus mirabilis</i> (7)	KPC-2	3	3
	NDM-1	2	2
	Positivos	5	5
	Negativos	2	2
<i>Morganella morganii</i> (6)	KPC-2	3	3
	NDM-1	1	2
	Positivos	4	4
	Negativos	2	2

Tabla 4. Tabla de contingencia del Método de Inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detección de genes de resistencia a los carbapenems			
Método de inactivación de Carbapenems (mIC)	Positivo	Negativo	Total
Positivo	47	0	47
Negativo	1	16	17
Total	48	16	64

Tabla 5. Validez de la prueba diagnóstica: Determinación de la Sensibilidad y especificidad del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN)

Parámetro	Cálculo	IC 95% Inferior-Superior
Sensibilidad	97.92%	(89.1, 99.63)
Especificidad	100%	(80.64, 100)

Tabla 6. Seguridad de la prueba diagnóstica: Determinación del valor predictivo positivo y negativo del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN)

Parámetro	Cálculo	IC 95% Inferior-Superior
Valor Predictivo Positivo	100%	(92.44, 100)
Valor Predictivo Negativo	94.12%	(73.02, 98.95)

Tabla 7. Determinación del nivel de concordancia (Índice Kappa) del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos (BGN) con respecto a la prueba de oro.

Parámetro	Cálculo	IC 95% Inferior-Superior
Índice Kappa	0.9592	(0.7144 - 1.204)

Tabla 8. Resultado de la prueba de evaluación diagnóstica (Método de inactivación de Carbapenems) frente a la prueba de oro (PCR punto final) en Bacilos gram negativos no fermentadores.

Especies de Bacilos gram negativos no fermentadores	PCR	N°	mIC+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (36)	VIM	7	7
	IMP	7	7
	SPM	2	1
	KPC-2	2	1
	Positivos	18	16
	Negativos	18	13
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (14)	OXA 48	2	2
	OXA 23	1	1
	OXA 51	2	1
	Positivos	5	4
	Negativos	9	7

Tabla 9. Tabla de contingencia del Método de Inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos no fermentadores (BGNNF)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detección de genes de resistencia a los Carbapenems			
Método de inactivación de Carbapenems (mIC)	Positivo	Negativo	Total
Positivo	20	7	27
Negativo	3	20	23
Total	23	27	50

Tabla 10. Validez de la prueba diagnóstica: Determinación de la Sensibilidad y especificidad del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos no fermentadores (BGNNF)

Parámetro	Cálculo	IC 95% Inferior-Superior
Sensibilidad	86.96%	(55.32, 86.83)
Especificidad	74.07%	(55.32, 86.83)

Tabla 11. Seguridad de la prueba diagnóstica: Determinación del valor predictivo positivo y negativo del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF)

Parámetro	Cálculo	IC 95% Inferior-Superior
Valor Predictivo Positivo	74.07%	(67.87, 95.46)
Valor Predictivo Negativo	86.96%	(66.96, 88.76)

Tabla 12. Determinación del nivel de concordancia (Índice Kappa) del Método de inactivación de Carbapenems (mIC) en Bacilos gram Negativos no fermentadores (BGNNF) con respecto a la prueba de oro.

Parámetro	Cálculo	IC 95% Inferior-Superior
Índice Kappa	0.6025	(0.3289 - 0.8762)

DISCUSIÓN

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, y la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas.

La expresión de las carbapenemasas no es siempre homogénea y se producen fenómenos de heterorresistencia. Este hecho se ha demostrado claramente con las enterobacterias y las metalobetalactamasas que hace que los valores de CIM no sean en ocasiones reproducibles y se sitúen en un amplio rango de concentraciones, incluso por debajo del punto de corte de sensibilidad. No obstante, estas CIM también pueden ser muy elevadas por la superposición con otros mecanismos de resistencia.

Desde un punto de vista práctico y una vez observado en el antibiograma la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, generalmente ilustrado por la sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos, es importante verificar que existe un mecanismo de inactivación de los carbapenémicos.

Los resultados presentados por Zwaluw y col. (2015) para la validación del Método de Inactivación de Carbapenems (mIC), en la detección de carbapenemasas mostró: para bacilos gram negativos (BGN) una sensibilidad del 100% y especificidad de 98.6% y en Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) una sensibilidad de 96% y una especificidad de 99.28%.

En este estudio los resultados obtenidos fueron: para bacilos gram negativos (BGN) una sensibilidad del 97.92% y una especificidad del 100% y en Bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) una sensibilidad de 86.96 % y una especificidad de 74.07 %. Los resultados discrepantes en la sensibilidad y especificidad del método para la detección de carbapenemasas en bacilo gram negativos no fermentadores (BGNNF), los falsos negativos (3 aislamientos) se puede atribuir a que no se establecieron inicialmente los puntos de corte o los tamaños de los halos de inhibición; en el estudio de Zwaluw y col. (2015) no define en la metodología si existe alguna medida del diámetro del halo que indique si la cepa en estudio está en zona gris (indeterminado), de igual manera se observaron colonias dentro del halo que dificultaban su interpretación. Es importante resaltar que los números de muestra positivas para estos genes de resistencia (Spm=2 aislamientos, KPC=2 aislamientos, OXA51=2 aislamientos) no fue significativa; otros elementos importantes que pudiesen explicar los falsos negativos pueden ser inherentes al método; como la subjetividad a la hora de interpretar los resultados y las diferencias técnicas interlaboratorios.

J.A. Reyes Chacón y col. (Feb, 2017), en su publicación utilizaron 179 aislamientos de Bacilos gram negativos (BGN) para la detección de carbapenemasas (KPC) con el método de Inactivación de Carbapenems (mIC), obteniendo una sensibilidad y especificidad mayor o igual al 99% y una concordancia Kappa de 1, estos resultados son comparables con los obtenidos en este estudio. El estudio de J.A. Reyes Chacón y col. presentó una interpretación de los resultados en la lectura de los halos de inhibición, los autores mencionan que aislamientos positivos (con el gen blaKPC) no presentan halos de inhibición y aislamientos negativos (sin el gen blaKPC) presentan halos superiores a

20mm, en su estudio no se evidenciaron resultados con halos entre 6 y 20mm; señalan que de ocurrir este evento se recomienda el uso de otra técnica disponible. De igual manera, no se estudiaron aislamientos que incluyeran a los Bacilos gram negativos no fermentadores.

Gauthier et al. (marzo 2017), su estudio se basó en una evaluación retrospectiva y prospectiva donde se evaluaron 256 aislamientos de Bacilos gram negativos (BGN) obteniéndose una sensibilidad de 95.5% y especificidad del 99.2%; estos resultados son semejantes a los obtenidos. En el estudio de Gauthier et al. no se evaluaron los bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF).

En abril del 2017, Pierce VM et al. publicó un estudio en donde se hace una modificación del protocolo original, ellos lo describen como Método de inactivación de Carbapenems modificado (mCIM), en donde se hizo una sustitución de los reactivos utilizados en una de las etapas de incubación (Caldo TS en lugar de agua), además se alargó el tiempo de incubación, pasó de 2 horas a 4 horas. Estos cambios en los tiempos de incubación del aislamiento con el disco de meropenem en caldo de TSB, mejoran la detección de carbapenemasas con una actividad hidrolítica más débil (usualmente no afectan a las C3G, ni monobactames), bajos niveles de expresión o para las metalobetalactamasas que requieren cationes divalentes para su actividad (VIM_IMP_SPM_NDM).

También definieron en este estudio los diferentes rangos de interpretación: donde halos de 6 a 15 mm son considerados positivos para la presencia de carbapenemasas; halo entre 16 y 18mm son aislamiento en zona indeterminada y se sugiere usar otra metodología para la sospecha de carbapenemasas y aislamiento con halos mayores o

iguales a 19mm son considerados negativos. Finalmente, con las modificaciones realizadas se evidenció que Método de inactivación de Carbapenems modificado (mCIM) tiene una sensibilidad de 98% y especificidad del 99.5%. Valores muy similares con los obtenidos en este estudio. Al igual que en los estudios anteriores no utilizaron aislamientos de bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF).

En este estudio se detectaron 7 falsos positivos en BGNNF, es importante resaltar que con bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan “enmascarar” el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad, la presencia de bombas de expulsión, afectación de las PBP's o presencia simultánea de otras betalactamasas.

J.A. Reyes Chacón y col. (Feb, 2017), en su estudio evidenciaron el rendimiento de las pruebas fenotípicas en enterobacterias resistentes a los carbapenémicos tipo KPC en donde el mIC mostró una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN mayor o igual al 99%

CONCLUSIONES

1. El método de inactivación de Carbapenems (mIC), demostró ser un método de bajo costo en cuanto reactivos e insumos, de igual manera su metodología es sencilla.
2. El método de inactivación de Carbapenems (mIC) permite la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos (BGN) con una sensibilidad y especificidad de 97.92% y 100% respectivamente.
3. Para los bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) la sensibilidad y especificidad del método fue de 86.96% y 74.07% respectivamente.
4. El valor predictivo positivo del método para la detección de carbapenemasas en BGN fue del 100%, mientras que para BGNNF fue de 74.07%.
5. El valor predictivo negativo en BGN fue del 94.12%, mientras que para los BGNNF 86.96%.
6. El grado de concordancia del método de inactivación de carbapenems (mIC) con respecto a la prueba de oro (PCR punto final) para BGN fue de 0.9592; mientras que para BGNNF fue de 0.6025.
7. El mIC, permite detectar la presencia de carbapenemasas en BGN, sin embargo, en este estudio el desempeño en BGNNF no es bueno; aunque estudios recientes ya describen una modificación más, de este método para mejorar la búsqueda de estas enzimas en BGNNF.
8. El mIC, aunque permite detectar la presencia de carbapenemasas en BGN no permite diferenciarlas entre ellas.
9. Los resultados obtenidos son comparables con el método de referencia, permitiendo detectar estas enzimas a un menor costo y fácil implementación.

RECOMENDACIONES

1. El mIC, se recomienda su metodología en Bacilos gram negativos (BGN).
2. Se debe procesar un control positivo (cepa productora de carbapenemas) y un control negativo (cepa no productora de carbapenemasas) para validar el método.
3. Se recomienda realizar el control de calidad del disco de meropenem, control de calidad de caldo de tripticasa y soya (TSB), del medio de Mueller Hinton para evitar errores de lectura, contaminación que puedan causar falsos positivos.
4. Es importante en el desarrollo de la prueba respetar los tiempos de incubación y sobre todo al sacar el disco de meropenem del caldo de TSB, intentar presionarlo un poco evitando que el disco se dañe para eliminar el excedente de caldo y ocasione dudas al momento de la lectura.
5. Realizar otros estudios con el mIC, ya que este año 2018 tiene una variante más que permite la identificación de carbapenemasas tipo MBL en *Pseudomonas aeruginosa*.
6. El laboratorio de microbiología debe conocer la epidemiología de su entorno, reconocer cambios en los puntos de cortes de agentes bacterianos que pueden ser productores de estas enzimas carbapenemasas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Panamá: mortal bacteria conocida como KPC mató a 46 personas. (2011). El Comercio - Mundo. Retrieved 14 February 2017, from 11. <http://elcomercio.pe/mundo/actualidad/panama-mortal-bacteria-conocida-como-kpc-mato-46-personas-noticia-1099073>
2. Van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G., Bootsma, H., de Neeling, A., & Schouls, L. (2015). The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. PLOS ONE, 10(3), e0123690. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
3. Guerra B1, Fischer J2, Helmuth R2. (2014). An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds.. 14-02-2017, de PubMed Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629777>
4. Lucía Gallegoa, Miren Josune Canduelaa, Elena Sevillanoa, Idoia Pujanaa, Felicitas Calvob , Adelaida Umarana y Gloria Martínc. (2004). Detección de carbapenemasas en clones de Acinetobacter baumannii resistentes a imipenem. 14-02-2017, de Elsevier Sitio web: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-carbapenemasas-clones-acinetobacter-baumannii-S0213005X04730840>
5. Guler, A. (2011). [Http://www.jcam.com.tr/files/KATD-157.pdf](http://www.jcam.com.tr/files/KATD-157.pdf). Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2(2). doi:10.4328/jcam.220
6. Mecanismos de Resistencia. (2015). In: *Asamblea Mundial de la Salud*. [online] Available at: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_20-sp.pdf [Accessed 23 Feb. 2017].

7. Fariñas, M., & Martínez-Martínez, L. (2017). *Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores*. Retrieved 12 July 2017.
8. Gómez de La Torre, J. (2016). *Diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas* (1st ed.). Lima, Perú: Juan Carlos Gómez de La Torre.
9. Vanegas-Múnera JM, Roncancio-Villamil G, Jiménez-Quiceno JN. Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. Rev CES Med 2014; 28(2): 233-246
10. Infecciones por Klebsiella , Enterobacter y Serratia - Enfermedades infecciosas <http://www.merckmanuals.com/es-us/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-klebsiella,-enterobacter-y-serratia>
11. Infecciones por Pseudomonas y microorganismos relacionados - Enfermedades infecciosas. <http://www.merckmanuals.com/es-us/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-microorganismos-relacionados>
12. World Health Organization. WHO report on infectious diseases: Removing obstacles to healthy development. Geneva, 1999. WHO/CDS/99.1

13. Organización Mundial de la Salud. (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. 14 de octubre de 2017, de OMS Sitio web: http://www.antibioticos.msssi.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
14. Cercenado, Emilia, Cantón, Rafael. *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
15. Ellington M. J., Kistler J., Livermore D. M., Woodford N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 321–322 10.1093/jac/dkl481